



УКРАЇНА

(19) UA (11) 64452 (13) U
(51) МПК (2011.01)
A61K 38/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) ЗАСТОСУВАННЯ ГЕНА АПОЛІПОПРОТЕЇДУ Е (апоЕ) ЯК ЗАСОБУ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ КАРДІОСКЛЕРОЗУ

1

2

(21) u201104115

(22) 05.04.2011

(24) 10.11.2011

(46) 10.11.2011, Бюл.№ 21, 2011 р.

(72) ГРИНЧАК НАТАЛЯ МИКОЛАЇВНА, ПІСКУН
РАЇСА ПЕТРІВНА, ІСТОШИН ВАЛЕРІЙ МИХАЙ-
ЛОВИЧ

(73) ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ ІМ. М.І. ПИРОГОВА

(57) Застосування гену аполіпопротеїду Е (апоЕ)
як засобу для профілактики кардіосклерозу.

Корисна модель належить до медицини, а саме - до експериментальної фармакології і прикладної морфології, стосується застосування засобів для профілактики експериментального кардіосклерозу.

Враховуючи те, що дане захворювання характеризується багатогранністю патогенезу, відомий спосіб лікування атеросклерозу коронарних артерій полягає у використанні препаратів різних фармакологічних груп і з різним механізмом дії. Сюди відносяться гіполіпідемічні засоби, антитромбоцитарні, антиангінальні, антиаритмічні, серцеві глікозиди, сечогінні, метаболічні препарати та інші. (Солошенко О. Аспекты метаболической терапии при заболеваниях сердечно-сосудистой системы. - Український медичний часопис, 1(75) - І/І 2010).

Не дивлячись на створення великої кількості нових лікарських препаратів, що здатні ефективно знижувати рівень атерогенних ліпопротеїдів в крові (наприклад статини), частота серцево-судинних захворювань серед населення високорозвинених країн залишається достатньо високою. Такий стан потребує розробки та застосування принципово нових підходів у лікуванні атеросклерозу - основної причини цих захворювань. Перераховані вище групи лікарських засобів діють лише симптоматично і через свою однонаправлену дію не можуть повністю охопити всі патогенетичні механізми атеросклерозу у серці, а також дають ефект тільки на час прийому препаратів. Вузький спектр дії вказаних препаратів обумовлює їх комплексне використання, а, як відомо, одночасне використання декількох препаратів з різних груп, які рекомендуються для лікування даної патології, може призвести до

їх взаємодії та зниження терапевтичного ефекту. У той же час не вдається розробити надійні засоби, які б збільшували рівень антиатерогенних ліпопротеїдів високої щільності, що значно знизило б ризик клінічних проявів атеросклерозу. В основу корисної моделі «Застосування гену аполіпопротеїду Е (апоЕ) як засобу для профілактики кардіосклерозу» поставлено задачу - шляхом введення гену апоЕ підвищити ефективність та безпечність фармакотерапії і розширити арсенал засобів для профілактики кардіосклерозу. Це визначає нові підходи до лікування атеросклерозу за допомогою генної терапії. Із генетичних чинників, які стосуються атерогенезу, на сьогодні відомі поліморфні гени аполіпопротеїду В, аполіпопротеїду Е (апоЕ), ліпопротеїдліпази, рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, білка-переносника ефірів холестерину, параоксонази, ангіотензиногена, рецепторів ангіотензину II, ендотеліальної синтетази оксида азоту, глютатіон - S - трансферази (Минушкина Л.О., Затейщиков Д.А., Чумакова А.С. и др. «Ассоциация аллеля E₂ гена аполипротеина Е и инфаркта миокарда у пациентов с ишемической болезнью сердца» // Сб. тезисов Российского национального конгресса кардиологов (Санкт-Петербург, 8-11 октября 2002 г.). - СПб, 2002. - С. 267.; Takis Athanopoulos, James S.Owen "Intramuscular injection of a plasmid vector expressing human apolipoprotein E limits progression of xanthoma and aortic atheroma in apoE-deficient mice", - Human Molecular Genetics, 2000, Vol.9, No.17, 2545-2551). Тому, на наш погляд, більш доцільним для лікування атеросклерозу може бути застосування генної терапії, дія якої спроможна одночасно впливати на різні ланки патогенезу за-

UA (11) 64452 (13) U

хворювання, які б сприяли регресу склеротичних змін в органах, а особливо в серці.

АпоЕ - одноланцюговий білок, що складається з 299 амінокислотних залишків, молекулярна маса - 34 кДа. АпоЕ входить до складу різноманітних класів ліпопротеїнів плазми. Білок апоЕ складається з двох доменів: один зв'язується з ліпідом, а другий визначає пов'язання з апоЕ-рецепторами і клітинним глікокаліксом. Синтезується в основному в печінці і мозку, причому вони абсолютно не залежні один від одного, оскільки апоЕ не здатний здолати бар'єр між кров'ю і церебро-спинальною рідиною. У крові апоЕ визначає поглинання ремнантів хіломікронів і ремнантів ліпопротеїнів дуже низької щільності (ЛПДНЩ). Зараз у ссавців ідентифіковано сім рецепторів, лігандом яких є апоЕ. Всі ці рецептори належать до еволюційно-консервативного сімейства рецепторів ліпопротеїнів низької щільності. Ген апоЕ людини локалізується в хромосомі 19 і знаходиться в кластері з іншими аполіпопротеїнами апоС1 і апоС2. Ген складається з 4 екзонів, 3 інтронів, 3597 пар нуклеотидів. Ген характеризується поліморфізмом. АпоЕ відіграє найважливішу роль в метаболізмі, транспорті та регуляції рівня холестеролу та тригліцеридів [Machley R.W., 1988; Килимчук В. Контроль липидного спектра крові - неотъемлемое условие лечения и профилактики сердечно-сосудистых заболеваний //Здоровья України, №11-12, 2007, с. 7-8; Талалаев Т.В. з співав. Системний характер порушень обміну ліпопротеїнів крові як основа патогенезу атеросклерозу //Журнал АМН України/, 2007, т. 13, №1. - с. 45-64]. Встановлено, що апоЕ і ангіотензин-перетворюючий фермент (АСОВІ) відіграють важливу роль в ліпідному метаболізмі, а оскільки серцево-судинні захворювання є головною причиною смерті людини, то вони безпосередньо впливають на тривалість життя. Білок апоЕ бере участь в створенні, секреції, транспорті і зв'язуванні макромолекулярних ліпопротеїдних комплексів. АпоЕ захищає коронарні артерії від атеросклеротичних уражень шляхом видалення атерогенних залишкових ліпопротеїнів. Перенесення гена апоЕ дозволяє покращити ліпідний профіль і чинить сприятливу дію на стан пошкоджених ділянок, а саме запобігає розвитку атеросклерозу або призводить до його зворотного розвитку.

В дослідженні були використані кДНК гена Апо-Е людини, субклонована в вектор рUC18, представлена професором G.Dickson і дослідником Т. Athanassopoulos (факультет біохімії Королівського Лондонського університету, Великобританія) і вектор рCMV.SPORT6 ("Invitrogen", США), який має цитомегаловірусний промотор і сигнал поліаденілування SV40, що дозволяє експресувати клоновану в ньому послідовність ДНК в еукаріотичних клітинах. кДНК гена Апо-Е переклонували у вектор рCMV.SPORT6, по сайтах рестриктаз Smal і Sall, вектор обробляли рестриктазами HindIII і Sall, при цьому кінці ДНК після обробки рестриктазою HindIII затуплювали за допомогою фрагмента Кленова. Отриману конструкцію рCMV.SPORT6 - Апо-Е виділяли в препаративних кількостях методом лужного лізису, використовуючи реактиви і колон-

ки тип500 фірми "Qiagen" (США). (Білошицька А.В, Піскун Р.П., Горбатюк С.М. та ін. Морфофункціональні дослідження ефективності генної терапії при експериментальному атеросклерозі // Фактори експериментальне еволюції організмів//, том 7, 2009, - с. 298-303).

Експерименти проведено на білих лабораторних щурах-самцях масою тіла 150-170 грамів, які утримувались на стандартному раціоні в умовах науково-експериментальної клініки Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова. Створювали модель експериментального атеросклерозу шляхом згодовування щурам-самцям холестерину в дозі 0,5 г/кг та введенням 4(6) - Метил-2-тіоурацил в дозі 12 мг/кг маси тіла для пригнічення функції цитоподібної залози, протягом 30 днів. При формуванні моделі профілактичної групи вводили ген апоЕ по 50 мкг на тварину внутрішньом'язово в перший день досліді. Ефективність дії апоЕ оцінювали за динамікою ЕКГ, макро- та мікроморфометричних, морфологічних, ультраструктурних та біохімічних досліджень.

В досліді була застосована модель склеротичного ураження серця, що відображає найбільш типові зміни, які можна спостерігати у клініці при ураженні цього органа. Щури були поділені на такі групи: 1 група - інтактні тварини, 2 група - щури, яким протягом 30 днів моделювався атеросклероз, щоденно згодовуючи холестерол в дозі 0,5 г/кг маси тіла і 4(6) - Метил-2-тіоурацил в дозі 12 мг/кг, 3 група - «профілактична», щури, яким в перший день моделювання атеросклерозу вводили ген апоЕ по 50 мкг на тварину внутрішньом'язово.

Для комплексної оцінки стану серця за умов експериментальної патології без корекції та на фоні застосування гена апоЕ, були проведені дослідження динаміки ЕКГ, макроморфометричних показників, біохімічні дослідження ліпідного спектра сироватки крові, також були проведені гістологічні дослідження тканин серця, вивчені ультраструктурні зміни міокарду щурів. Статистичну обробку цифрових даних проводили за допомогою загальноприйнятих методів статаналізу на комп'ютері з використанням стандартних пакетів програми MS Excel 97.

Аналізуючи результати електрокардіограм тварин першої (інтактної) групи ми отримали дані, які свідчать, що порушень ритму, провідності та порушень коронарного кровообігу тварини не мали. У більшості тварин 2 групи (з експериментальним атеросклерозом) переважає реакція тахікардитичного типу: частота серцевих скорочень, в порівнянні з інтактними тваринами, зростає на 5,01 %, а амплітуда зубця S зменшується на 22,9 %. У тварин профілактичної групи вказані показники становлять відповідно 1,6 % та 10 %.

Результати макрометричного дослідження показали, що застосування атерогенної дієти призвело до вираженої структурної перебудови серця. Відмічаються зміни як планіметричних, так і вагових показників лівого шлуночка (ЛШ). Так, площа стінки правого шлуночка (ЛШ) у тварин з атеросклерозом перевищує даний показник у інтактних тварин на 5,23 %, а площа стінки ПШ збільшується

на 14,9 % порівняно з аналогічним показником інтактної групи. Зростання даних показників свідчить про наявність об'ємного навантаження на серце і, як наслідок, виникнення дилатації його порожнини. Також зазнають змін і гравіметричні показники морфометрії. Так, абсолютна маса серця у тварин з експериментальним атеросклерозом на 3,75 % більше, ніж у тварин інтактної групи. Абсолютна маса ЛШ зростає на 7,12 %, а абсолютна маса ПШ - на 4,70 %. Відповідно питома маса ЛШ у тварин з експериментальним атеросклерозом зростає на 2,33 %, а питома маса ПШ зменшується на 3,51 %. Індекс Фултона збільшується на 2,49 %, площа лівої поверхні МШП збільшується на 2,17 %. Такі зміни вказаних показників свідчать про гіпертрофію окремих частин міокарда, в більшій ступені лівого шлуночка, а також розширення камер серця та зменшення кількості функціонально здатної тканини міокарда на одиницю площі. У тварин профілактичної групи, в порівнянні з тваринами з експериментальним атеросклерозом без корекції, зменшилась абсолютна маса серця на 3,68 %, абсолютні маси ЛШ та ПШ відповідно на 5,01 % і на 5,05 %. В даній групі відмічаються позитивні зміни планіметричних показників. Так, зменшились площі стінок ЛШ та ПШ, збільшився планіметричний індекс на 1,38 %. Отримані дані свідчать про нормалізацію більшості вивчених показників макроморфометрії.

В результаті холестеринового навантаження у тварин, яким моделювали експериментальний атеросклероз, зростають майже всі мікрометричні показники кардіоміоцитів, порівняно з тваринами інтактної групи, а саме: площа кардіоміоцитів - на 25,44 %, площа їх ядер - на 21,92 %, максимальний діаметр кардіоміоцитів - на 6,98 %, мінімальний діаметр кардіоміоцитів - на 13,72 %, максимальний діаметр ядер - 11,2 %, мінімальний діаметр

ядра - 13 %, ядерно-цитоплазматичне співвідношення зменшується на 3,5 %. Таким чином, навантаження холестерином призводить до виникнення виражених гіпертрофічних змін в міокарді експериментальних тварин. Використання гена апоЕ з метою профілактики призводить до наступних позитивних змін порівняно з тваринами з експериментальним атеросклерозом: площа кардіоміоцитів зменшується на 2,11 % менше; площа ядра - на 7,07 %, а ядерно-цитоплазматичне співвідношення на 3,6 % менше ніж у тварин з атеросклерозом.

Отже, в результаті проведених досліджень було встановлено, що дія гена апоЕ сприяє зменшенню пошкодження міокарду щурів з експериментальним кардіосклерозом. На це вказувала статистично вірогідна нормалізація показників електрокардіографії. Крім того введення гена апоЕ з профілактичною метою показує тенденцію до нормалізації концентрації в сироватці крові загального холестерину, ліпопротеїнів низької щільності і тригліцеридів. Також відмічений позитивний вплив дії апоЕ на показники планіметрично-вагової кардіометрії. Всі ці явища корелювали з позитивною динамікою мікоморфометричної та ультраструктурної картини серця. Так, при використанні гена в мікропрепаратах серця практично не виявлялись вогнища жирової дистрофії та некрозу кардіоміоцитів, спостерігались ознаки покращення мікроциркуляції та репарації в серцевому м'язі.

Таким чином, проведене дослідження показало, що введення гена апоЕ дає достатньо виразну гіполіпідемічну, протисклеротичну та кардіопротекторну дію в умовах експериментального кардіосклерозу. Запропонований засіб сприятиме обмеженню можливої поліпрагмазії, і, тим самим, підвищенню ефективності та безпечності лікування кардіосклерозу.